



EP 98/08405

REC'D 03 MAR 1999	
WIPO	PCT

EJU

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Wolf-Georg F o r s s m a n n in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Insulin-like growth factor binding protein und seine Verwendung"

am 22. Dezember 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 07 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Januar 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

G. Gellert

Aktenzeichen: 197 57 250.2

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

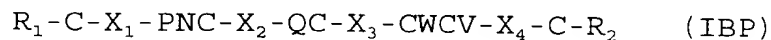
972191de Me/Sch-gn

22. Dezember 1997

Insulin-like growth factor binding
protein und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide mit zellproliferativen und zellprotektiven Eigenschaften, Komplexe der Peptide mit humanem Insulin-like growth factor I und II sowie die damit in Verbindung stehenden Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörper und Inhibitoren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide mit der Aminosäuresequenz der Formel



worin

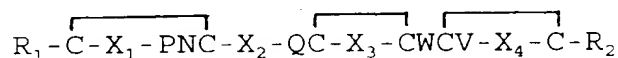
R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend bis zu 41 Aminosäuren, X_1 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 24 bis 31 Aminosäuren, X_2 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 9 Aminosäuren, X_3 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 10 Aminosäuren, X_4 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 18 bis 24 Aminosäuren, R_2 $COOH$, $CONH_2$ oder ein Peptid

mit bis zu 12 Aminosäuren darstellt und cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte, sulfatierte Derivate sowie Fragmente mit der physiologischen Fähigkeit des IBP.

Das Peptid weist zellproliferative und zellprotektive Eigenschaften auf.

Diese Peptide werden als Insulin-like growth factor binding protein (IBP) bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen Peptide können Disulfidbrücken aufweisen, so daß sie der allgemeinen Formel



entsprechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Peptide an einer oder mehrerer der folgenden Positionen der Aminosäuresequenz ein Glycin auf. X_2 an Position 4, X_3 an Position 9, X_4 an Position 4 oder 5 und/oder X_4 an Position 9 oder 10.

Es ist weiter bevorzugt, daß X_1 an der Position 8 L oder V ist und/oder X_1 an der Position 11 L oder I ist und/oder X_2 an der Position 1 D oder N ist und/oder X_2 an der Position 9 K oder R ist und/oder X_3 an der Position 3 S oder A ist und/oder an der Position 8 R oder A ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird R_1 ausgewählt aus

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEP,
GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTP
KGKGGKHHLGLEEPKKLRPPPARTP,
GHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGP,
KVNGAPREDARPVPQGS,

LTQSKFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGP,
PQAGTARPQDVNRRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGP und/oder

X₁ ausgewählt aus

RIELYRVVESLAKAQETSGEEISKFYL,
QQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHI,
RREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHI,
QSELHRALERLAASQSRTHEDLYIPI,
RRHMEASLQELKASPRMVPRAVYL,
RRHLDSVLQQLOTEVYRGAQTLYV,

X₂ ausgewählt aus

NKNGFYHSR,
DKHGLYNLK,
DKKGFYKKK,
DRNGNFHPK,
DRKGFYKRK,
DHRGFYRKR und/oder

X₃ ausgewählt aus

ETSMDGEAGL,
KMSLNGQRGE,
RPSKGRKRGF,
HPALDGQRGK,
KPSRGRKRG I,
RSSQGQRRGP und/oder

x₄ ausgewählt aus

YPWNGKRIPGSPEIRGDPN,
NPNTGKLOQGAPTIRGDPE,
DKYGQPLPGYTTKGKEDVH,
DRKTGVKLPGGLEPKGELD,
DKYGMKLPMEYVDGDFQ,

DRMGKSLPGSPDGNGSSS und/oder

R₂ ausgewählt aus

QIYFNVQN,
HLFYNEQQEARGVHTQRMQ,
HLFYNEQQE,
YSMQSK,
HQLADSFRE,
HTFDSSNVE,
PTGSSG.

Die erfindungsgemäßen Peptide lassen sich durch Aufreinigung aus humanem Blutfiltrat oder Urin, durch Festphasenpeptidsynthese oder durch Expression in rekombinanten Mikroorganismen erhalten.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die Komplexe der erfindungsgemäßen Peptide mit humanem Insulin-like growth factor-I und/oder humanem Insulin-like growth factor-II sowie dessen physiologisch aktiven Fragmenten und/oder Derivaten, insbesondere amidierter, acetylierter, sulfatierter, phosphorylierter und/oder glykosylierter Derivate.

Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus Nucleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, Antisense-nucleotide, die unter stringenten Bedingungen an eine Nucleinsäure binden, die für das erfindungsgemäße Peptid kodiert, Antikörper, die an die erfindungsgemäßen Peptide binden, Inhibitoren, die die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Peptiden hemmen, Inhibitoren, die die Expression von IBP hemmen.

Die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörper und Inhibitoren eignen sich insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Über- oder Unterexpression von IBP, zur Be-

handlung von Muskelschwund, Osteoporose, Diabetes, amyloider lateraler Sklerose, peripheren und zentralen Neuropathien, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen, Wachstumsstörung, Erkrankung der Muskulatur, Erkrankung des Knochenapparates und/oder zur Wund- und Knochenheilung.

Die erfindungsgemäßen Peptide und die Komplexe der Peptide mit Insulin-like growth factor weisen eine zellproliferative Aktivität auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide regulieren die Freisetzung des IGF-I und IGF-II aus den Komplexen an ihrem Wirkort. Die Coadministration der erfindungsgemäßen Peptide mit IGF-I oder IGF-II verlängert die biologische Halbwertszeit und damit die Verfügbarkeit der letztgenannten. Die durch Injektion von freiem IGF-I oder IGF-II induzierte Hypoglykämie wird durch die Coadministration der erfindungsgemäßen Peptide verhindert.

Die erfindungsgemäßen Peptide haben desweiteren eine wachstumsfördernde Wirkung auf Knochenzellen und führen zu einer Verstärkung oder Modulation der Wirkung von Wachstumshormonen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisense-nucleotide, Antikörper und Inhibitoren in einer pharmazeutisch üblichen Darreichungsform in einem Arzneimittel enthalten. Sie eignen sich zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung oder als Aerosol zur transpulmonalen Applikation. Die Menge an zu verabreichenden Peptid beträgt 1 µg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren und/oder Antisense-

nucleotide eignen sich auch zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung somatischer oder nicht-somatischer Gen-erkrankungen.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisense-nucleotide, Antikörpern und/oder Inhibitoren.

Bevorzugterweise enthält das Diagnostikmittel poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid, wobei die Antikörper fluoreszenz- oder radioaktiv-markiert sein können, um in den bekannten ELISA oder RIA eingesetzt werden zu können. Jedoch kann das Diagnostikmittel auch Nucleinsäuren enthalten, die in modifizierter oder markierter Form in dem Fachmann bekannten Tests wie PCR oder Finger-Printing zum Einsatz kommen.

Die erfindungsgemäßen Diagnostikmittel eignen sich insbesondere zur Diagnose von Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darm-Traktes, des Immunsystems, von Diabetes, inflammato-rischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs.

Die Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptids bzw. seine Komplexes wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

Aufreinigung und peptidchemische Analyse des IBP-2-13

Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch ein Reinigungsver-fahren ausgehend vom humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses patentierte Verfahren (Forssmann, W.-G. (1988), Offenlegungs-schrift DE 36 33 707 A1), welches für die Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hämofiltrat entwickelt wurde, wurde in modifizierter Form auch zur Aufreinigung des Peptidkomplexes

eingesetzt.

Hämofiltrat-Batch-Extraktion

Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an.

800 bis 1.000 l Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH-Wert von 2,7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5,5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 l/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
Fluß: 3 l/min
Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A: Hämofiltrat pH 2,7, Leitfähigkeit
5,5 mS/cm
Puffer B: 0,5 M Ammoniumacetat
Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
(PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftragung der insgesamt 1.000 l Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0,5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6,8 bis 7,2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 l Eluat erreicht.

Erste präparative Auftrennung

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in Mengen von 5.000 bis 10.000 l Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf 2,7 wird das Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5,5

mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
 Fluß: bis zu 3 l/min während des Auftrages, 0,5
 bis 1 l während der Elution
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
 Probe: Hämofiltrat pH 2,7, Leitfähigkeit
 5,5 mS/cm
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0,01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Leitfähigkeit (mS/cm)
Waschpuffer	2,0	0,01 M HCl	1
Elutionspuffer 1:	3,6	0,1 M Zitronensäure-1-hydrat	2,9
Elutionspuffer 2:	4,5	0,1 M Essigsäure + 0,1 M Natriumacetat	4,0
Elutionspuffer 3:	5,0	0,1 M Äpfelsäure	6,2
Elutionspuffer 4:	5,6	0,1 M Bernsteinsäure	6,1
Elutionspuffer 5:	6,6	0,1 M NaH ₂ PO ₄	4,9
Elutionspuffer 6:	7,4	0,1 M NaH ₂ PO ₄	6,7
Elutionspuffer 7:	9,0	0,1 M Ammoniumcarbonat	6,7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt und abschließend mit VE-Wasser gespült. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 l erreicht werden.

Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reverse Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule: FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial: Source RPC, 15 μ m 10 x 12,5 cm
(FineLine 100)
Fluß: 150 mL/min (FineLine 100)
Detektion: 280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A: 10 mM HCl
Puffer B: 80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient: 0 bis 60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Aliquots der Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Assay bioaktiven Fraktionen 11 und 12 aus pH-Pool V wurden über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 21 bis 25 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Vydac RP-C18 15-20 μ m, 300 Å
Puffer A: 0,1% TFA
Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient: 5 bis 50% B in 45 min,
50 bis 100% B in 10 min
Fluß: 42 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieranlage: BioCad
Fraktionen: á 1,5 min ab Start des Gradienten

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 21 bis 25 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden über die gleiche semipräparative Reverse Phase Säule aufgetrennt. Als Laufmittel wurde jedoch Methanol verwendet. Die Fraktion 24 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Vydac RP-C18 15-20 μ m, 300 Å
Puffer A: 0,1% TFA, 20% Methanol
Puffer B: 0,1% TFA, 100% Methanol
Gradient: 0 bis 20% B in 6,5 min,
20 bis 80% B in 55 min,
80 bis 100% B in 13 min
Fluß: 30 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieranlage: BioCad
Fraktionen: á 1,5 min ab Start des Gradienten

Kationenaustauschchromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 19 und 20 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden über eine Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 45 bis 47 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1 cm x 5 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Pepkat, Biotek 5 μ m, 300 Å
Puffer A: 20 mM Natriumphosphat, pH 3,0
Puffer B: 20 mM Natriumphosphat, pH 3,0, 1,5 M NaCl
Gradient: 0 bis 50% B in 50 min,
50 bis 100% B in 10 min
Fluß: 3 ml/min

Detektion: 280 nm

Chromatographieanlage: BioCad Sprint

Fraktionen: á 1,5 min ab Start des Gradienten

Analytische Reverse-Phase Chromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 45 bis 47 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden sukzessive in mehreren identischen Läufen über eine Reverse Phase - Säule aufgetrennt. Die Fraktion 56 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1 cm x 25 cm Stahlsäule

Füllmaterial: Vydac RP-C18 5 μ m, 300 Å

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril

Gradient: 5 bis 50% B in 45 min,
50 bis 100% B in 10 min

Fluß: 2 ml/min

Detektion: 220 nm

Chromatographieanlage: Kontron

Fraktionen: á 1 min ab Start des Gradienten

Zweite Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die bioaktive Fraktion 56 aus dem vorhergehenden Trennschritt wurde auf einer analytischen Reverse-Phase Säule weiter aufgereinigt.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,46 cm x 25 cm Stahlsäule

Füllmaterial: YMC RP-C18, 5 μ m, 300 Å

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril

Gradient: 15 bis 50% B in 75 min,
75 bis 100% B in 10 min

Fluß: 0,7 ml/min

Detektion: 214 nm
Chromatographieanlage: Kontron

Dritte Analytische Reverse-Phase C3-Chromatographie:

Ein Teil der bioaktiven Fraktion 45 aus dem vorhergehenden Trennschritt wurde direkt der Massen- und Sequenzanalyse unterzogen. Ein anderer Teil wurde reduziert und alkyliert (wie unter Beispiel 2 beschrieben) und dann auf einer analytischen Reverse-Phase Säule weiter aufgereinigt.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,1 cm x 15 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Zorbax RP-C3, 5 μ m, 300 Å Analytik verwandt wird, deutlich.

Massenbestimmungen

Alle Massenbestimmungen der unmodifizierten und modifizierten Peptide wurden auf einem MALDI-TOF Massenspektrometer durchgeführt. Die Molekülmassen der Peptide wurden als

IGF-II, 7471 Da;
IBP-2, 12 681 Da;
IBP-2, 12 865 Da

bestimmt.

Bestimmung von Cysteinen/Modifizierung von Peptiden

Cysteine lassen sich nach vorheriger chemischer Derivatisierung, zum Beispiel nach Reduktion mit β -Mercaptoethanol und Carboxamidomethylierung mit Iodacetamid, in der Peptid-Sequenzierung nachweisen. Nach der Derivatisierung schließt sich eine Entsalzung vorzugsweise über eine analytische Reverse-Phase Chromatographie mit einer Vydac RP-C18 Säule

(4,6 mm x 25 cm) an. Ein Teil der so modifizierten Peptide werden der Sequenzanalyse zugeführt, mit dem anderen Teil ergeben die Massenbestimmungen ein entsprechendes Molekulargewicht. Aus der Massendifferenz zum nativen Peptid wird geschlossen, daß die Peptide aus Hämofiltrat sechs Cysteine enthalten, welche zudem mit drei Disulfidbrücken untereinander verbunden sind.

Sequenzbestimmung

Sowohl die aufgereinigten nativen als auch die carboxamidomethylierten Peptide werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert.

Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Massenbestimmungen ergaben sich folgende N-terminale Sequenzen:

IBP-2-13, MW 12681

(reduziertes und mit Jodacetamid modifiziertes Molekül, MW 13045)

Aminosäuren

GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQV...

IBP-2-13, MW 12865

(reduziertes und mit Jodacetamid modifiziertes Molekül, MW 13223)

Aminosäuren

GKGGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQV...

IGF-II, MW 7471

Aminosäuren

AYRPSETLCGGEL....

Der C-Terminus wurde durch den Vergleich der gemessenen

Molekularmasse mit der aus der Sequenz berechneten Masse bestimmt. Die Übereinstimmung dieser Massen liegt in der Meßgenauigkeit des MALDI-TOF-Massenspektrometers von 0,1% der Gesamtmasse.

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nucleinsäure Datenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenzen besitzt eine hundertprozentige Identität zu den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen IBP-2 bzw. zur Aminosäuresequenz von IGF-II.

IBP-2 wurde bisher als ein 34 kD großes Bindungsprotein beschrieben, dessen vollständige Sequenzanalyse durch Analyse der zugehörigen cDNA (Binkert, C. et al., EMBO Journal Vol. 8 (1989), Seiten 2497 bis 2502) erfolgte. IGF-II und auch IGF-I, welches ebenfalls an IBP-2 bindet, wurden dagegen in ihrer Struktur auf Protein- und DNA-Sequenzebene schon umfangreich beschrieben (als Review: Rechler, M.M., & Nissley, S.P. (1990) Insulin-like growth factors In: Peptide growth factors and their receptors (Spori, M.B., Roberts, A.B. eds.), Seiten 263 bis 367, Springer-Verlag, Berlin).

Beispiel 2

Bestimmung der biologischen Aktivität des IGF/IBP-2-13

Die Isolierung des IGF/IBP-2-13 erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Überlebensassay der PC-12 (Pheochromocytom-Zellen)-Zelllinie. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefrieretrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen.

Der Assay mißt das Überleben der Zellen, nachdem sie serumfrei gehalten wurden, indem 24 Stunden nach Serumentzug die Aktivität mitochondrialer Enzyme bestimmt wird. Als Positivkontrolle wird in diesem Assay Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt.

In 96 Loch-Platten werden 10.000 PC-12 Zellen pro Loch in serumfreien Medium ausgesät. Es erfolgt die Zugabe von Aliquots (ca. 100 µl Äquivalent des Ausgangsmaterials) in die wells. 20 Stunden später wird die Überlebensrate der Zellen mittels eines Wst-1 Substrats gemessen. Dieses Substrat wird von mitochondrialen Enzymen umgesetzt. Die entstehende Farbstoffintensität wird bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen, die Referenzwellenlänge liegt dabei bei über 600 nm.

Der IGF/IBP-2-13 Komplex besitzt in dosisabhängigerweise eine überlebensfördernde Wirkung auf PC-12 Zellen. Diese Zellen entsprechen neuronalen Vorläuferzellen, so daß man davon ausgehen kann, das IGF/IBP-2-13 ein neuroprotektiver Faktor ist.

Beispiel 3

Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptids IBP-4-11

Die Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptid IBP-4-11 erfolgte bis zur Stufe der zweiten präparativen Auftrennung völlig analog zu der unter Beispiel 1 beschriebenen Aufreinigung des IBP-2-13. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch

Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Assay bioaktive Fraktion 33 aus pH-Pool IV wurden über eine analytische Reverse-Phase-Säule aufgetrennt. Die Fraktion 34 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Vydac RP-C4 5 ym, 300 Å
Puffer A: 0,1% TFA
Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient: 0 - 80% B in 80 min,
80 - 100% B in 10 min
Fluß: 2,5 ml/min
Detektion: 230 nm
Chromatographieanlage: Kontron
Fraktionen: á 1 min ab Start des Gradienten

Massenbestimmungen

Die Massenbestimmungen wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer durchgeführt. Die Molekülmasse des Peptids wurden als

IBP-4-11, 11 344 Da

bestimmt.

Sequenzbestimmung

Die Aminosäuresequenz des aufgereinigten nativen, biologisch aktiven Peptids IBP-4-11 wurde wie unter Beispiel 1 auf der Seite 13 beschrieben durchgeführt.

Es ergab sich die folgende N-terminale Sequenz:

IBP-4-11, MW 11344 Da

KVNGAPREDARPVPQGSXQSELIIRALERL...

Der C-Terminus wurde durch den Vergleich der gemessenen Molekülmasse mit der aus der Sequenz berechneten Masse bestimmt. Die Übereinstimmung dieser Massen liegt in der

Messgenauigkeit des Elektrospray-Massenspektrometers von 0,1% der Gesamtmasse.

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nucleinsäuredatenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenz besitzt eine hundertprozentige Identität zu den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen IBP-4.

Bestimmung der Schwefelbrückenverknüpfung des IBP-4-11

Die Analyse der Schwefelbrückenverknüpfung erfolgte, indem das native Peptid IBP-r-11 parallel in zwei verschiedenen Ansätzen mit den Endoproteasen Chymotrypsin und Arg-C gespalten wurde. Die erhaltenen Spaltfragmente wurden dann mittels analytischer Reverse Phase Chromatographie voneinander getrennt und der Molekularmassen- und Sequenzanalyse unterzogen. Folgende Fragmente, welche jeweils zwei Cysteine und eine Schwefelbrücke enthalten, wurden erhalten:

HPKQCHPALDGQRGKCW, MW 1960

CVDRKTGVKLPGGLEPKGELDCHQLADSF, MW 3112

PVPQGSCQSELHR

MW 3236

THEDLYIIPNCDR

Daraus ist ersichtlich, daß im nativen IBP-4-11 die Schwefelbrücken zwischen Cystein 1 und 2, zwischen Cystein 3 und 4 sowie zwischen Cystein 5 und 6 ausgebildet sind.

Beispiel 4

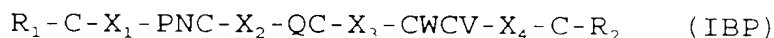
Bestimmung der biologischen Aktivität des IBP-4-11

Die Isolierung des IBP-4-11 erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Proliferationsassay mit primären Knochenzellen (Osteoblasten), die zunächst aus Schädeldecken von Rattenembryonen isoliert werden

Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 3 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefrieretrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen. Der Assay mißt die Proliferation der Zellen, indem 48 oder 72 Stunden nach Zugabe der Fraktionen der Einbau von radioaktivem Thymidin, also die DNA-Syntheserate, bestimmt wird. Als Positivkontrolle wird in diesem Assay Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt. In 96 Loch-Platten werden 5.000 Osteoblasten-Zellen pro Loch in serumhaltigem Medium ausgesät. Es erfolgt die Zugabe von Aliquots (ca. 100 ml Äquivalent des Ausgangsmaterials) in die wells. 48 oder 72 Stunden später wird die Proliferationsrate (DNA-Syntheserate) der Zellen mittels der Zugabe und des Einbaus von radioaktivem Thymidins gemessen. Das Peptid IBP-4-11 besitzt in dosisabhängigerweise eine proliferationsfördernde Wirkung auf diese primären Osteoblasten. Diese Zellen entsprechen typischen Knochenzellen, so daß man davon ausgehen kann, das IBP-4-11 ein osteoanaboler Faktor ist.

A n s p r ü c h e

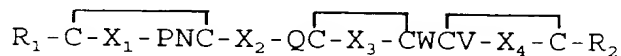
1. Peptide mit der Aminosäuresequenz der Formel



worin

R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend bis zu 41 Aminosäuren, X_1 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 24 bis 31 Aminosäuren, X_2 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 9 Aminosäuren, X_3 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 10 Aminosäuren, X_4 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 18 bis 24 Aminosäuren, R_2 $COOH$, $CONH_2$ oder ein Peptid mit bis zu 12 Aminosäuren darstellt und cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte, sulfatierte Derivate sowie Fragmente mit der physiologischen Fähigkeit des IBP.

2. Peptide gemäß Anspruch 1 mit Disulfidbrücken der Formel



3. Peptide gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß X_2 an Position 4 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_3 an der Position 9 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_4 an der Position 4 oder 5 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_4 an der Position 9 oder 10 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist.
4. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß X_1 an der Position 8 oder V ist und/oder X_2 an der Position 11 oder I ist und/oder X_2 an der Position 1 D oder N ist und/oder X_2 an der

Position 9 K oder R ist und/oder X_3 an der Position 3
S oder A ist und/oder an der Position 8 R oder A ist.

5. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß R_1 ausgewählt wird aus

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEP,
GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTP
KKGKHHHLGLEEPKKLRPPPARTP,
GHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGP,
KVNGAPREDARPVPPQS,
LTQSKFVGGAEHTAHPRIISAPEMRQESEQGP,
PQAGTARPDQVNRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGP.

6. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß X_1 ausgewählt wird aus

RIELYRVVESLAKAQETSGEEISKFYI,
QQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHI,
RREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHI,
QSELHRALERLAASQSRTHEDLYIPI,
RRHMEASLQELKASPRMVPRAVYL,
RRHLDSVLQQQLQTEVYRGAQTLYV.

7. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß X_2 ausgewählt wird aus

NKNGFYHSR,
DKHGLYNLK,
DKKGFYKKK,
DRNGNFHPK,
DRKGFYKRK,
DHRGFYRKR.

8. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß X_3 ausgewählt wird aus

ETSMGDGEAGL,
KMSLNGQRGE,
RPSKGRKRGF,
HPALDGQRGK,
KPSRGRKRGI,
RSSQGQRRGP.

9. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß X_4 ausgewählt wird aus

YPWNGKRIPGSPEIRGDPN,
NPNTGKLOQGAPTIRGDPE,
DKYGQPLPGYTTKGKEDVH,
DRKTGVKLPGGLEPKGELD,
DKYGMKLPGMEYVDGDFQ,
DRMGKSLPGSPDNGSSS.

10. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß R_2 ausgewählt wird aus

QIYFNVQN,
HLFYNEQQEARGVHTQRMQ,
HLFYNEQQE,
YSMQSK,
HQLADSFRE,
HTFDSSNVE,
PTGSSG.

11. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 durch Aufreinigung aus humanem Blutfiltrat oder Urin, durch Festphasenpeptidsynthese oder durch Expression in rekombinanten Mikroorganismen.

12. Komplexe von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 mit hIGF-I (humaner Insulin-like growth factor-I, MW 7649) oder hIGF-II (humaner

Insulin-like growth factor-II, MW 7491) sowie dessen biologisch aktive Fragmenten und/oder Derivaten, insbesondere amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten und/oder glykosylierten Derivaten.

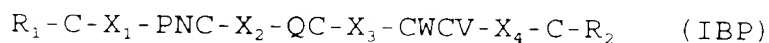
13. Nucleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert.
14. Antisensenucleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es unter stringenten Bedingungen eine Nucleinsäuresequenz bindet, die für ein Peptid gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert.
15. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er an ein Peptid gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 bindet.
16. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die biologische Aktivität von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 hemmt.
17. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die Expression von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 hemmt.
18. Verwendung von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, Komplexen gemäß Anspruch 12, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 13, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Unterexpression von IBP.
19. Verwendung von Antisensenucleotiden gemäß Anspruch 14, Antikörpern gemäß Anspruch 15, Inhibitoren gemäß Anspruch 16 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 17 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Überexpression IBP.

20. Verwendung von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, Komplexen gemäß Anspruch 12, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 13, Antisensenucleotiden gemäß Anspruch 14, Antikörpern gemäß Anspruch 15, Inhibitoren gemäß Anspruch 16 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 17 zur Behandlung von Muskelschwund, Osteoporose, Diabetes, amyloider lateraler Sklerose, peripheren und zentralen Neuropathien, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen, Wachstumsstörung, Erkrankung der Muskulatur, Erkrankung des Knochenapparates und/oder zur Wund- und Knochenheilung.
21. Arzneimittel enthaltend Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, Komplexe gemäß Anspruch 12, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 13, Antisensenucleotiden gemäß Anspruch 14, Antikörpern gemäß Anspruch 15, Inhibitoren gemäß Anspruch 16 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 17 in einer pharmazeutisch üblichen Darreichungsform zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung oder als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
22. Verwendung der Nucleinsäure gemäß Anspruch 13 und/oder der Antisensenucleotide gemäß Anspruch 14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung somatischer oder nicht-somatischer Generkrankungen.
23. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, Komplexe gemäß Anspruch 12, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 13, Antisense-nucleotide gemäß Anspruch 14, Antikörpern gemäß Anspruch 15, Inhibitoren gemäß Anspruch 16 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 17 sowie weitere Hilfsmittel.
24. Verwendung der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 23 zur

Diagnose von Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darm-Traktes, des Immunsystems, von Diabetes, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Peptide mit der Aminosäuresequenz der Formel



worin

R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend bis zu 41 Aminosäuren, X_1 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 24 bis 31 Aminosäuren, X_2 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 9 Aminosäuren, X_3 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 10 Aminosäuren, X_4 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 18 bis 24 Aminosäuren, R_2 $COOH$, $CONH_2$ oder ein Peptid mit bis zu 12 Aminosäuren darstellt und cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte, sulfatierte Derivate sowie Fragmente mit der physiologischen Fähigkeit des IBP.

bp1n

bp2

bp3

bp4

bp5

bp6

1 APSEEDHSILUDRAISTYDGSKQALHUTNIKKUKEPCRIELVROUESLAK AQETSG EEISKFYLPNCNKG
1 GKGGKHHLGLEEKKLPPPPARTPCQQLDQULERISTHRLPDERGPLEHLYSLHI PNCCKHG
1 GHAKDSQYKYDYESOSTDTQNFSSSKRETEYGPCRREMEDTLNHLKF LNVLSPRGUHI PNCCKKG
1 KUNGRPREDAARPUPQGSQSELHBALELRAA SQSRTH EDLYIPI PNCCKRG
1 LTQSKFUGAENTAHPRISAPENRQESQGPCRBHMEASLQELKA SPRNUP RAUYL PNCCKRG
1 PQAGTARPQDUNARDDQQRNPCTSTTPSQPN\$AGUQDTENGPCRBHLD\$ULQQLQT EUYRGA QTLYU PNCCKRG

bp1n

bp2

bp3

bp4

bp5

bp6

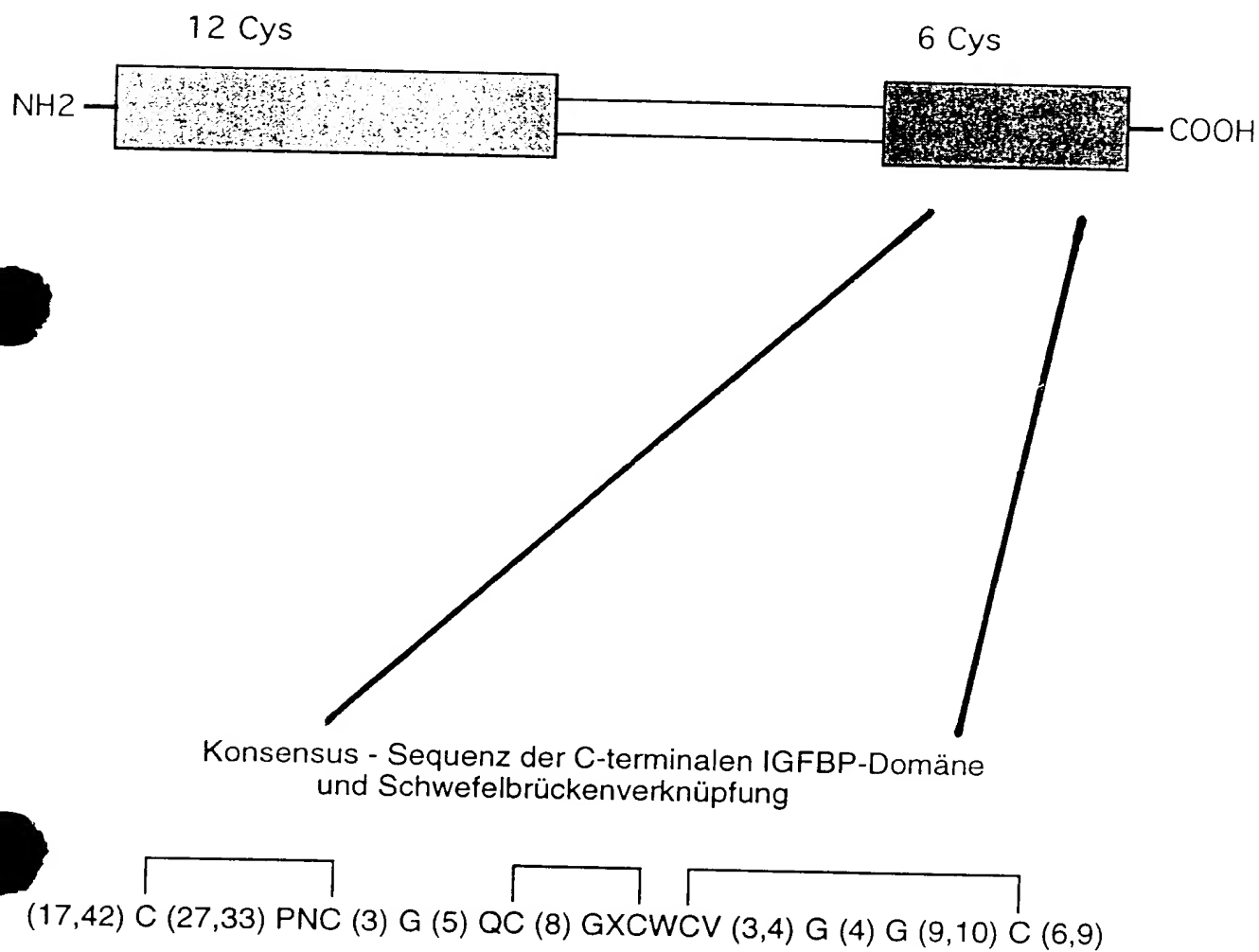
70 FVHSRQCET\$MDGEAGLCUCUYPUNGKRI PG SPEIRGDPNCQIYFNUQN
64 LYNLKQCKMSLNGORGE CUCUNPNITGKLIQG APTIRGDP ECHLFYNEQ QEARGUHTQRNQ
68 FYKKKQCAPSKGRKRGFCUCUDKV GQPLPGYTTKGKEDUHCYSNQSK
53 NFHPKQCHPGLDQGRGK CUCUDRKITGUKLPG GLEPKGELDCHQLAD\$FRE
65 FYKAKQCKPSRGRKRGICUCUDKV GMKLPG MEYUDGD FQCHTFDSSNUE
74 FYRKRQCRSSQGRRGPCUCUDRN GKSLPG SPDGN\$SS\$CPTGSSG

Figur 1

Schematische Grundstruktur der IGFBP's

IGFBP 1 - 6

insges. jew. 250-350 Aminosäuren



Figur 2



1 1 1 1